

氏名	茶 園 博 人		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	第 4018 号		
学位授与年月日	平成13年 9 月28日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当者		
学位論文名	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> 由来トレハロースホスホリラーゼおよび新規ホスホリラーゼに関する研究		
論文審査委員	主 査 教 授	南 浦 能 至	副主査 教 授 谷 口 誠
	副主査 助教授	飯 塚 勝	

### 論 文 内 容 の 要 旨

新規オリゴ糖の酵素的合成を目的に、大量安価に生産されるようになったトレハロースを基質にして微生物を対象に検索したところ、嫌気性好熱菌 *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 の無細胞抽出液にトレハロースから非還元性三糖を生成する酵素系が存在することを見出した。そこで、この非還元性三糖の構造解析並びにトレハロースからの生成機構、とくに、それに関与する酵素の解明及びこれら酵素を用いた種々オリゴ糖の合成を試みた。

非還元性三糖を単離、精製し、構造解析した結果、本糖質は2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル  $\alpha$ -D-グルコピラノシル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド (2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース)であることが分かった。この糖質はセラギノースと命名されている既知糖質であったが、トレハロースからのセラギノース合成にはトレハロースホスホリラーゼと新規ホスホリラーゼとが関与していることが分かった。無細胞抽出液から二つの酵素をそれぞれ精製し、性質及び基質特異性を検討した。*T.brockii* ATCC35047 由来トレハロースホスホリラーゼは、これまで知られている酵素の中で最も耐熱性が高かった。もう一つの酵素、新規ホスホリラーゼは、D-グルコースと $\beta$ -グルコース-1-リン酸( $\beta$ -G1P)とからコージピオースを生成した。この新規ホスホリラーゼをコージピオースホスホリラーゼと命名した。トレハロースからのセラギノース生成は、先ずトレハロースホスホリラーゼの作用によりトレハロースからグルコースと $\beta$ -G1Pが生成し、次いでコージピオースホスホリラーゼの作用により $\beta$ -G1Pとトレハロースとからセラギノースが生成するという反応機構によることが明らかとなった。また、*T.brockii*由来ホスホリラーゼ類を用いることにより、ガラクトシルグルコシド、グルコシルソルボース、グルコシルスクロース、コージオリゴ糖など、種々オリゴ糖を調製できたことから、これら酵素が新規オリゴ糖の合成に有用であることを明らかにすることができた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

自然界に種々の二糖は数多く存在するが、それら二糖に特異的なホスホリラーゼはあまり知られていない。また、その転移反応を利用して、新規有用オリゴ糖の酵素合成は、これまであまり試みられていない。本論文は、二糖特異的新規ホスホリラーゼの発見とそれによる新規オリゴ糖の開発を目的とした研究を纏めたものである。

著者は先ず、トレハロースを唯一の炭素源とする培地を用いて、ホスホリラーゼを生産する微生物を検索し、嫌気性好熱菌の1菌株、*Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047、の無細胞抽出液がトレハロースから非還元性三糖(セラギノース、2-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース)を合成すること

を発見した。セラギノースはイワヒバから単離されている希少の既知糖質であるが、この糖の合成に関わる酵素を無細胞抽出液から精製し、性質を詳細に検討した結果、2種の酵素、すなわち、一つはトレハロースに作用してグルコースと $\beta$ -G1Pを生成する酵素で、既知の酵素の中で最も耐熱性が高いトレハロースホスホリラーゼであり、他の一つは $\beta$ -G1Pとトレハロースとからセラギノースを合成する未知の酵素（コージビオースホスホリラーゼと命名、コージビオースに作用してグルコースと $\beta$ -G1Pを生成する酵素）であることを明らかにした。次いで著者は、応用研究として精製した上記の2種の酵素の受容体特異性を克明にしらべ、酵素の転移反応を利用して、ガラクトシルグルコシド、グルコシルソルボース、グルコシルスクロース、コージオリゴ糖などの種々オリゴ糖の調製を試み、ホスホリラーゼがオリゴ糖合成に有用であることを示した。

上述の様に、本論文は新規二糖ホスホリラーゼの発見とそれを利用するオリゴ糖の合成法の確立は、糖質工学のみならず生物分子機能学、特に酵素化学の分野に著しく貢献するものであり、博士（理学）の学位授与に値するものと審査した。